

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA FOSFAT-UKLANJAJUĆIH BAKTERIJA U
BIOLOŠKOM PROČIŠĆAVANJU OTPADNIH VODA

THE ROLE OF PHOSPHATE-ACCUMULATING
BACTERIA IN BIOLOGICAL WASTEWATER
TREATMENT

SEMINARSKI RAD

Andreja Colnar

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of biology)

Mentor: doc. dr. sc. Jasna Hrenovi

Zagreb, 2010.

SADRŽAJ

1. UVOD	2
2. EUTROFIKACIJA VODA	3
3. POLIFOSFAT-AKUMULIRAJU I ORGANIZMI (PAO).....	5
4. OLAKŠANO BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA (EBPR).....	8
4.1. Metaboli ka rekonstrukcija <i>Accumulibacter phosphatis</i>	9
5. LITERATURA	11
6. SAŽETAK.....	12
7. SUMMARY.....	12

1.UVOD

Zanimanje za pro i š avanjem otpadnih voda javilo se još po etkom 20. stolje a. Sustav kanalizacija dugo se vremena smatrao velikim problemom i izvorom zaraza u urbanim naseljima tijekom povijesti. Još u davna vremena se prepoznala važnost ljudskog ekskreta kao sredstva za gnojenje pa su tako stari Grci (300 pr. Kr. do 500 g.) su koristili javne latrine koje su se izljevale u cijevi i odvodile fekalije i kišnicu u spremnik za sakupljanje izvan grada(5). Odatle odvodima izgra enim od poredanih cigli ta se otpadna voda usmjeravala prema oranicama zbog gnojenja. Sustav kanalizacija su kasnije preuzeli i Rimljani te ga dodatno usavršili (5). Stolje ima se sustav kanalizacije usavršavao sve do danas, diljem svijeta. Danas se uvi a potreba za smanjenjem umjetno proizvedenih nutrijenata kao što je anorganski fosfor, višak dušika u prirodi koji dolaze sa oranica,iz otpadnih voda ku anstava, tvornica i uzrokuju veliko nakupljanje u okolišu koje ima negativan utjecaj na živi svijet u vodi i oko nje.

Danas postoji više oblika biološkog pro i š avanja voda. Sam postupak biološke obrade otpadnih voda zahtjeva odgovaraju e uvjete kako bi se proces obrade otpadnih voda odvijao. Sekundarna ili biološka obrada obuhva a biološke postupke u kojima se djelovanjem mikroorganizama uklanjaju otopljeni organski sastojci i anorganski sastojci, te suspendirane estice preostale nakon primarne obrade (14). U sekundarnoj obradi otpadne vode, ovisno o podrijetlu, za uklanjanje otpadnih sastojaka primjenjuju se biološki i anaerobni postupci temeljeni na razli itom odnosu mikroorganizama prema otopljenom kisiku. Biološki postupci uklanjanja sastojaka otpadnih voda su: biooksidacija, nitrifikacija, denitrifikacija, postupci uklanjanja fosfata i anaerobna obrada nastalog mulja (14). U ovom se radu govori uglavnom o postupcima uklanjanja fosfata iz otpadnih voda.

Jedan takav proces koji postaje sve zastupljeniji u tretmanu otpadnih voda je olakšano biološko uklanjanje fosfora (EBPR, enhanced biological phosphorus removal). Taj postupak omogu uje kvalitetno uklanjanje fosfata iz okoliša bez pove anja saliniteta i tako uspješno obavlja regeneriranje voda koje se vra aju u okoliš. Iako taj model pro i š avanja razvijen još od po etka razvijanja modela u pro i š avanju voda, u širokoj upotrebi se pojavio sa pojavom niskobudžetnih osobnih ra unala i prezentacijom jedinstvenog modela aktivnog mulja.

2. EUTROFIKACIJA VODA

Fosfor je nezaobilazna komponenta vodenih ekosustava. Djeluje kao gnojivo i potiče rast biljaka u vodenim staništima. No previsoke koncentracije fosfora mogu biti pogubne za vodena staništa. Fosfati su najveći i krivci za eutrofikaciju zbog akumulacije, dok istovremeno nutrijent koji također utječe na eutrofikaciju je dušik, ali on teži denitrificiranju zbog čega se akumulira u puno manjoj mjeri (12).

Eutrofikacija je najveća prijetnja sa kojom se suočava život u vodi i upravo je fosfor odgovoran za proces eutrofikacije. Eutrofikacija se javlja kada su koncentracije fosfora i dušika vrlo visoke, jer oboje djeluju kao gnojiva, zagađuju vodu i potiču bujanje biljnog svijeta u vodi. Nakon perioda cvjetanja algi, alge se uginuti, pasti na dno i taložiti se. Razgradnja algi daje gorivo za razvoj bakterija, čiji metabolizam koristi kisik. To postaje problem zbog neprirodno visoke stope potrošnje kisika i količina otopljenog kisika se smanjuje, a o njemu ovisi život u vodi. Zbog toga dolazi do hipoksije što je vrlo stresno za život u vodi, ili u najgorem slučaju dolazi do anoksičnog stanja koje dovodi do uginuća živog svijeta u vodenom staništu (12). Takva područja bez kisika zovu se mrtvim zonama (12) (Sl.1).



Slika 1. Rasprostranjenost mrtvih zona diljem svijeta

(<http://archive.wri.org>)

Rast algi na površini nije samo štetan za životinje koje žive u vodi, nego i za vodeno bilje. Biljke koje žive na oceanskom dnu, kao npr. morska trava, pružaju zaštitu i stanište mnogim životinjama. Ali porast broja algi na površini blokira sunčevu svjetlost i stoga ona ne dopire

do morske trave, što sprjeva fotosintezu i ujedno rast biljaka. Na ribnjacima ili pak jezerima eutrofikaciju prati nagli rast biljaka i javljanje tzv. deke korova (Sl. 2), pojave koja se javlja zbog velikog širenja filamentoznih algi (12). Takvo nakupljanje je takođe sprječilo prodiranje svjetlosti. Takve promjene bilo u slatkim vodama, morskoj vodi utječu snažno na promjenu ekosustava.



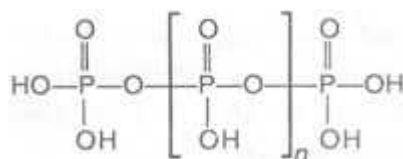
Slika 2. Deke korova na jezeru Erie

(<http://www.put-in-bay.com>)

Koliko god fosfor bio važan za vodene ekosustave isto toliko može biti štetan zbog umjetnog obogaćivanja okoliša fosforom. Višak fosfora u vodi smanjuje kvalitetu vode i staništa i na njega djeluje eutrofikacija. Višak fosfora i dušika uglavnom se javlja otjecanjem sa poljoprivrednih zemljišta, na kojima se koriste umjetna gnojiva, iako su mogući i neki drugi kao što su otpadne vode iz domaćinstava i tvornica. U uvjetima kada je eutrofikacija posljedica djelovanja ovjek, ona se može spriječiti tako da se ublaže simptomi i uklone uzroci. Danas je stoga potrebno baviti se kontroliranim puštanjem fosfata i dušika u okoliš i raditi na metodama koje će uspješno pročišćavati vodu i uklanjati fosfat koji ipak uzrokuje najviše štete.

3. POLIFOSFAT – AKUMULIRAJ I ORGANIZMI (PAO)

Biološki sintetizirani polifosfat (poliP) je linearni polimer ortofosfata (Pi) dužine lanca do 1000 ostataka i više. (Sl. 3) PolyP može služiti kao izvor P za biosintezu nukleinskih kiselina i fosfolipida u uvjetima nedostatka Pi. Iako biološka uloga poliP nije u potpunosti razjašnjena, poliP vjerojatno funkcionira kao Pi rezervoar sa osmotskim prednostima (3).



Slika 3. Struktura molekule polifosfata

(<http://www.studentsguide.in>)

Enzim odgovoran za biosintezu poliP je poliP kinaza (PPK), koja polimerizira terminalne Pi ATP-a u poliP u reverzibilnoj reakciji.

Bakterije koriste Pi kao izvor P. Kada je Pi dostupan u suvišku, onda se uzima Pi anorganskim transportom (Pit) (3). U tim uvjetima, bakterija može pohraniti Pi u obliku polyP. Bakterije imaju evoluirani kompleks sistema za preživljavanje u uvjetima nedostatka Pi. U takvim uvjetima, Pi-specifični transportni (Pst) sustav se uključuje i taj sustav onda služi kao glavni skupljač ostataka Pi. Bakterije koriste organofosfate (Pi estere), anorganske fosfate (Pt) i fosfonate kao alternativne izvore P, u slučaju kada Pi nije dostupan. Budući da većina Pi estera nije transportabilna, Pi se mora osloboditi organske sastavnice prije nego što se može koristiti (3).

Polifosfat – akumuliraju i organizmi (PAO) su skupina mikroorganizama, koje pod određenim uvjetima olakšavaju uklanjanje velikih količina fosfora iz otpadnih voda u procesu pod nazivom olakšano biološko uklanjanje fosfora (1).

Ovi organizmi uspijevaju u tome tako što fosfate akumuliraju u svojim stanicama u obliku poliP. Polifosfat akumuliraju i organizmi aktivno uzimaju topljivi P (fosfor) iz sustava i akumuliraju u obliku poliP granula (poznate i kao volutinska zrnca kada se promatraju bojanjem sa osnovnom bojom toluidinsko modriLO) (1). Ti organizmi nisu jedini koji mogu

tako akumulirati fosfate, ta funkcija je vrlo raširena među bakterijama. Ipak PAO imaju mnoga svojstva koje drugi organizmi koji akumuliraju poliP nemaju, što ih čini pogodnim za uporabu u pročišćavanju voda. Konkretno to je sposobnost konzumiranja jednostavnih ugljikovih spojeva (izvora energije), bez prisutnosti vanjskih akceptora elektrona (kao što su dušik ili kisik) generiranjem energije iz pohranjenih polifosfata i glikogena. Većina ostalih bakterija ne može konzumirati u takvim uvjetima i stoga PAO stječe selektivnu prednost između ostalih mikroba prisutnih u aktivnom mulju (6). Stoga pogoni za pročišćavanje otpadnih voda u kojima se odvija EBPR, imaju anaerobne spremnike (u kojima nema dušika ni kisika koji bi služili kao vanjski akceptori elektrona) koji prethode ostalim spremnicima, kako bi dali pristup PAO jednostavnim ugljikovim spojevima u otpadnim vodama koje se ulijevaju u postrojenje (6).

PAO srodan sa beta-proteobakterijama je identificiran i nazvan *Candidatus Accumulibacter phosphatis*. *Accumulibacter* se dokazao u odstranjivanju fosfora u EBPR pogonima u Australiji, Europi i SAD-u. Može konzumirati niz spojeva ugljika, kao što su acetati i propionat, u anaerobnim uvjetima i pohraniti ih kao polihidroksialkanoate (PHA) koji se troše onda za izvor ugljika i energije za rast koriste i kisik ili dušik kao akceptor elektrona (6).

Također, znanstvenici rade na ispitivanju nekih od mogućih mikroorganizama koji bi možda mogli obavljati funkciju PAO. *Acinetobacter* spp. je jedna od prvih bakterija predloženih za EBPR proces. Istraživanja su pokazala njenu nadmoć u procesima EBPR. Isprobane su različite metode kao što su fluorescentno bojanje antitijela, fluorescentna in situ hibridizacija oligonukleotidima specifičnim za *Acinetobacter*, kako bi se utvrdila pouzdanost te bakterije u uklanjanju fosfata. Neki izolirani sojevi *Acinetobacter* spp. akumuliraju poliP i PHA (polihidroksialkanoati) u aerobnim uvjetima. Ali nijedan od tih sojeva nije pokazao da posjeduje tipičnu metaboličku karakteristiku PAO-oboga enog mulja, a to su: uzimanje acetata i njegovu pretvorbu u PHA, te hidrolizu poliP i naknadno otpuštanje Pi u anaerobnim uvjetima (11). Još uvijek nije dokazano da se *Acinetobacter* spp. ponaša kao tipični PAO (11).

Microtholus phosphovorius je fiziološki sličan PAO na enima u obogaenom mulju. Akumulira velike količine poliP u aerobnim uvjetima. Ipak, nedostaje joj nekih ključnih metaboličkih svojstava: ne uzima acetat i ne akumulira PHA u anaerobnim uvjetima (11). Također, njena uloga u EBPR se još mora razjasniti i poboljšati.

Lamprospira spp. je bakterija koja može pohranjivati poliP i PHB (polihidroksibutirat). Ima mogućnost uzimanja acetata i pohranjivanja u obliku PHA s pratećom poliP degradacijom i otpuštanjem Pi u anaerobnim uvjetima (11). Funkcionalno

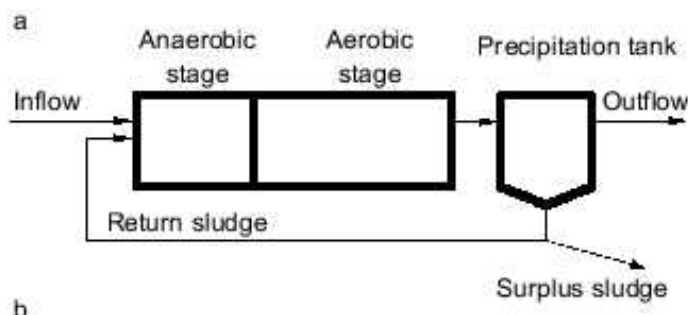
posjeduje ključne metaboličke osobine PAO, ali morfološki ima vrlo jedinstven plošast oblik stanice koji nije karakterističan za EBPR procese.

Sadašnja ispitivanja pokazuju da PAO nisu ograničeni na samo pojedine vrste mikroorganizama već obuhvaćaju širok spektar filogenetski i taksonomski udaljenih skupina mikroorganizama. Kako bi se jasno mogle definirati zajednice organizama odgovornih za EBPR procese potreban je detaljan uvid u ponašanje pojedinih mikroorganizama za koje se smatra da sudjeluju u EBPR procesu. Budući da se čini da većina PAO ne može održavati u kulturi, molekularne metode su zasigurno možda sredstva za omogućevanje tog cilja (2).

4. OLAKŠANO BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA (EBPR)

EBPR je jedan od najbolje proučenih mikrobioloških posredovanih industrijskih procesa, zbog njegove ekološke i ekonomske važnosti.

Pretjerano napajanje slatkih voda anorganskim fosfatima utječe negativno na kvalitetu vode i ravnotežu ekosistema u procesu eutrofikacije. Ograničenja dozvoljenog ispuštanja P_i u gradskim i industrijskim otpadnim vodama imaju dokazani učinak u smanjivanju količine P_i . Otkuće se povećanje određenih granica za P_i u tekućim otpadnim vodama i stoga će biti potrebne sve bolje metode za otklanjanje fosfata. Zbog velike količine otpadnih voda koje se moraju tretirati dnevno bilo koje poboljšanje u postojećim metodama imaće veliku ekološku i ekonomsku ulogu. EBPR je proces u kojem mikroorganizmi uklanjaju fosfat iz otpadnih voda akumulirajući ga unutar svojoj stanici kao polifosfat. Ti polifosfat akumuliraju i organizmi se smiju stavljati u odvojene spremnike (pročišćivače) i tako osiromašuju tekuću vodu fosfatima (6) (Sl. 4).



Slika 4. Shematski prikaz EBPR procesa.

(<http://protein.bio.msu.su>)

EBPR je mnogo ekonomičniji dugoročno gledano i ima manji učinak na okoliš nego tradicionalno kemijsko odstranjivanje P_i , ali je sklon nepredvidivim kvarovima uzrokovanim smanjenom aktivnošću mikroorganizama odgovornih za akumuliranje fosfata. To se događa zato što samo razumijevanje mikrobnog mulja još nije potpuno usavršeno. Ovaj proces se proučava već više od 30-tak godina kako bi se osposobio kao jako pouzdan industrijski proces. Već 30 godina bakterije roda *Acinetobacter* pogrešno se smatraju odgovornim za EBPR proces (6). Tek nedavno su istraživanja na neovisnim kulturama pokazala da je

4. 1. Metaboli ka rekonstrukcija A. phosphatis

The diagram illustrates the central carbon metabolism and energy coupling in a cell. It shows the flow of carbon from Acetate through Glyoxylate, Pyruvate, and the TCA cycle intermediates (Citrate, Isocitrate, α-Ketoglutarate, Succinyl-CoA, Succinate, Fumarate, Malate, Oxaloacetate) to various products like PHB, PHV, PH2MB, and PH3MB. It also illustrates the generation of ATP from ADP and Pi, and the role of various enzymes and cofactors like NADH, NAD+, and FAD. The diagram is divided into two main sections: the left side shows the generation of ATP and the right side shows the utilization of ATP for biosynthesis and energy coupling.

(<http://www.nature.com>)

Proizvodnja ekstracelularnih polimernih tvari (EPS) je esencijalna za opstanak *A. phosphatis* u tretmanu pročišćavanja otpadnih voda (2). EBP veže stanice *A. phosphatis* u guste nakupine koje su neophodne za taloženje u pročišćivačima. Stanice koje se ne mogu nataložiti i se isprati iz sustava. U genomu *A. phosphatis* postoje geni koji su odgovorni za proizvodnju EPS različitih fizikalnih i kemijskih svojstava. Geni za EPS se razlikuju ovisno o sojevima bakterija. Nagađa se da su klasteri EPS-a modularne strukture koje su promjenjive zbog nehomolognih rekombinacija kako bi se što bolje i brže prilagođavale lokalnim uvjetima npr. promjenjivom sastavu tekućine uzrokovanom strujanjem ili promjeni temperature (2).

Čini se da respiratorna nitrat-reduktaza nedostaje u *A. phosphatis*, jer proučavani muljevi u kojima dominira *A. phosphatis* ne mogu denitrificirati (2). Genom kodira ostatak denitrifikacijskog puta od nitrita nadalje i različite nitrat reduktaze. Smatra se da njoj nedostaje podjedinica koja inače funkcionira kao kvinol reduktaza i da kao takva ne može biti dio respiratornog lanca. To baca sumnju o sposobnosti *A. phosphatis* da uklanja nitrate. Ako *A. phosphatis* ne reducira nitrate, sporedne EBPR vrste moraju obavljati tu važnu zadaću u anaerobnim uvjetima (2). Nitrat reducirajuće populacije bi okupirale važne ekološke niše dobivljaju i populaciju *A. phosphatis* nitritom za respiraciju. Važno otkriće je da su u *A. phosphatis* pronađeni potpuni komplement gena za fiksaciju dušika što je energetski vrlo „skup“ proces. Ključni geni za fiksaciju CO₂ su također pronađeni, uključujući i fosforibulokinazu i veliku podjedinicu RUBISCA. Budući da otpadna voda sadrži velike količine vezanog dušika i lako dostupnog organskog ugljika, malo je vjerojatno da će ti geni biti izraženi u EBPR mulju. To sugerira da je *A. phosphatis* prilagođena okolišu u kojima je ograničena količina ugljika i dušika. Nadalje, prisutnost P_i nosača visokog afiniteta dozvoljava ovoj bakteriji funkcioniranje u okolišu limitiranom fosforom. To objašnjava prisutnost *A. phosphatis* u staništima gdje je ograničena količina nutrijenata. *A. phosphatis* također ima gene za biosintezu biotina, iako bi evolutivno bili prisutni u organizama iz EBPR mulja. Ako se nalaze u obilnoj vodi tada se biotin može razviti kako bi im olakšao kretanje prema izvoru nutrijenata.

5.LITERATURA

1. Bajekal Shyam. S and Dharmadhikari Neelam S. (2008.): Use of polyphosphate accumulating organisms (Pao) for treatment of phosphate sludge
2. Hector Garcia Martin, Natalia Ivanova, Victor Kunin, Falk Warnecke, Kerrie W Barry, Alice C McHardy, Christine Yeates, Shaomei He, Asaf A Salamov, Ernest Szeto, Eileen Dalin, Nik H Putnam, Harris J Shapiro, Jasmyn L Pangilinan, Isidore Rigoutsos, Nikos C Kyrpides, Linda Louise Blackall, Katherine D McMahon, and Philip Hugenholtz (2007): Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities
3. Hirota Ryuichi, Kuroda Akio, Junichi Kato and Hisao Ohtake (2009) : Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorous recovery and industrial bioprocesses
4. Maynumba Future, Wood Elizabeth and Horan Nigel : (2009) Meeting the phosphorus consent with biological nutrient removal under UK-winter conditions
5. Mogens Henze, Mark C. M. van Loosdrecht : Biological wastewater treatment
6. Oehmen Adrian, Lemos Paulo, Carvalho Gilda, Yuan Zhiguo, Keller Jurg, Blackall Linda L. , Reis Maria: (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale
7. Schultz Thomas: The use of microorganisms to remove contaminants from wastewater is effective and widespread. To choose the right system from the many options offered, understand the various techniques available and evaluate them based on your requirements
8. Seviour Robert, Mino Takashi and Onuki Motoharu (2003) : The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems
9. <http://archive.wri.org>
10. <http://www.nature.com>
11. <http://protein.bio.msu.su>
12. www.pollution.com
13. <http://www.studentsguide.com>
14. http://issuu.com/ag-metal/docs/bioloska_prerada_otpadnih_voda

6. SAŽETAK

Danas se velika pažnja poklanja biološkom pročišćavanju voda i radi se na razvijanju što boljih i ekonomičnijih tehnika koje bi to omogućile. Jedan od najvećih zagađivača je upravo anorganski fosfor, odnosno fosfati koji se nekontrolirano ispuštaju u okoliš. Stoga je potrebno uvesti što bolje nadzore nad tvornicama i poboljšati nadgledanje kvalitete voda. Sam proces biološkog uklanjanja fosfata temelji se na aktivnosti fosfat-uklanjajućih bakterija. Danas se rade ispitivanja kako bi se otkrilo koje su od tih bakterija najpogodnije za biološko pročišćavanje otpadnih voda. Rezultati tih ispitivanja bit će vrlo važni u budućnosti kako bi se sam postupak pročišćavanja voda što bolje usavršio te se time spriječila eutrofikacija izazvana djelovanjem ovjeka.

7. SUMMARY

Today, wastewater treatment is one of the most important issues in the world, and many scientists are working in order to improve more economic and cheaper techniques. One of the biggest pollutants are phosphates. Wastewater needs to be under control constantly in order to improve the better quality of water and to prevent the pollution. The process of biological removing of phosphates is based on the activity of phosphate-accumulating bacteria. Scientists are working to discover which of these organisms is the most competent in removing phosphate. This scientific research will be very important in the future, because we need economically and ecologically acceptable method of wastewater treatment in order to prevent eutrophication and pollution of environment.